

## 水稻种子寄藏真菌的3种检测方法对比研究

李小林<sup>1,2</sup> 谷安宇<sup>1,2</sup> 张馨宇<sup>1</sup> 徐雨然<sup>2</sup> 罗来鑫<sup>1</sup> 李健强<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业大学 农学与生物技术学院, 北京 100193;

2. 云南省农业科学院 粮食作物研究所, 昆明 650205)

**摘要** 通过研究3种水稻种子寄藏真菌检测方法的异同和适应性,为高水稻种子健康检测的针对性提供科学依据。以云南省具有代表性的3个主栽水稻品种楚粳26、滇优35和宜香9的种子为材料,采用洗涤法、PDA平板法进行种子寄藏真菌检测;同时采用滤纸保湿法对此3个品种以及富优80等产地海拔高度不同的共计20个水稻品种的种子进行检测。结果显示,洗涤法适用于种子外部带菌检测,洗涤时间为20 min,洗涤液稀释10倍涂平板可以观测记录带菌的数量,供试水稻种子外部主要携带 *Aspergillus*、*Fusarium*、*Penicillium*、*Alternaria*,它们出现的比例分别为21.4%、17.9%、16.7%和8.3%;PDA平板法可以满足整粒种子以及解剖后种子不同部位的寄藏真菌检测,结果与洗涤法基本一致,种子携带4个属真菌的分离比率分别为42.7%、25.6%、1.2%和4.9%;滤纸保湿法可较好地检测20个水稻品种整粒种子的带菌情况,共检测到24个属的真菌,主要优势菌为 *Aspergillus*、*Fusarium* 和 *Penicillium*,它们分别在14、19和18个供试品种中广泛分布,出现频率最大,而在版纳10号等少数地方种水稻种子中,上述3个属的真菌未检出或者检出频率明显降低。研究分析了种子类型、来源、产地海拔高度与种子寄藏真菌种类的关系,提出了对3种检测方法中获得的未知真菌分类地位进行进一步鉴定的建议。

**关键词** 水稻; 主栽品种; 种子健康; 寄藏真菌; 检测方法; 对比分析

中图分类号 S 511; S 871.85

文章编号 1007-4333(2011)06-0043-09

文献标志码 A

## Comparative analysis of three kinds of testing methods for rice seed borne fungi

LI Xiao-lin<sup>1,2</sup>, GU An-yu<sup>1,2</sup>, ZHANG Xin-yu<sup>1</sup>, XU Yu-ran<sup>2</sup>,  
LUO Lai-xin<sup>1</sup>, LI Jian-qiang<sup>1\*</sup>

(1. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. Institute of Food Crops, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China)

**Abstract** The differences and applicability of three methods for rice seed borne fungi testing were studied to provide scientific references to improve the accuracy of rice seed health testing. The seed borne fungi of japonica rice variety Chujing26, Dianyou35 and Yixiang9 which are mainly cultivated in Yunnan province were studied by using both washing test and PDA culture plate methods, and at the same time, the blotter moisture-retaining culture method was used to detect the seed born fungi of 20 rice hybrids, including Chujing26, Dianyou35, and Yixiang9 which were from production areas with different altitude. The results showed that washing test was applicable to detect the fungi on seed surface, the washing time was 20mins, and the washing solution with dilution ten times could be directly applied to PDA culture plate for fungi observation and counting. The *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, and *Alternaria* were mainly isolated from the external parts of rice seeds tested and their isolation frequency respectively were 21.4%, 17.9%, 16.7%, and 8.3%. PDA culture plate method was applicable to detect seed born fungi from one whole kernel or different parts of rice seed, and the test results were basically same with the results from wash test, the four major genera of fungi

收稿日期: 2011-04-11

基金项目: 云南省科技创新强省计划项目省院省校科技合作专项(2008AD010)

第一作者: 李小林, 副研究员, 博士研究生, 主要从事水稻种子生产与质量控制新技术研究, E-mail: xiaolinli@163.com

通讯作者: 李健强, 教授, 主要从事种子健康和种子病理学研究, E-mail: lijq231@cau.edu.cn

isolation frequency respectively were 42.7%, 25.6%, 1.2%, and 4.9%. There were totally 24 genera of fungi were detected from 20 rice hybrid seeds by the blotter moisture-retaining culture method, the dominant fungi were *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Penicillium* which were respectively detected from 14, 19 and 18 hybrids of rice seed and with high isolation frequency and widely distribution, but those three kinds of genera were failed to be detected or detected with very low isolation frequency from the seed of Banna10 and a few local rice varieties. The correlation between seed types, sources, altitude of production area, and the kinds of seed born fungi were analyzed to provide further references to identify and classify the unknown fungi isolated by above washing test, PDA culture plate and blotter moisture-retaining culture methods.

**Key words** rice; mainly cultivated varieties; seed health; seed borne fungi; testing method; comparative analysis

作物种子的品质包括遗传品质和播种品质。种子既是病害的受体,又是跨地区远距离传播病害的载体,种子是否携带病菌的检测备受关注<sup>[1]</sup>。水稻作为全球最重要的粮食作物之一,关于其带菌检测的研究报道很多,国际水稻研究所(IRRI)等先后出版了水稻种子健康检测方面的专门手册,对水稻种子健康和质量管理、水稻种子的生产和环境、检测设备、取样程序和样品管理、干检法以及包括种子传带的真菌、细菌、病毒、线虫,田间检验、种子处理以及杂草种子等的检测进行了详尽的描述<sup>[2]</sup>。部分研究集中在造成的水稻恶苗病的镰刀菌的生态学、遗传多样性、致病性和毒性<sup>[3]</sup>,水稻种子寄藏细菌的表型和遗传多样性及其在致病性和生物防治中的作用<sup>[4]</sup>,作为水稻生产中阻碍种子发芽的一种新种传病菌的管突弯孢(*Curvularia protuberata*)<sup>[5]</sup>,水稻等作物种子上的非活性物质与病原菌接种体来源的关系<sup>[6]</sup>,长期储存的种质资源中真菌的评价<sup>[7]</sup>,水稻种传病原真菌与水稻非正常秧苗的关系<sup>[8]</sup>,水稻种传格氏霉(*Gerlachia oryzae*)菌侵染种子和对秧苗的危害<sup>[9]</sup>。国内研究先后报道了黑龙江、四川等水稻产区种子寄藏的病原真菌<sup>[10-11]</sup>,笔者所在研究室报道了水稻品种种子带菌检测及药剂消毒处理效果<sup>[12-13]</sup>,也有关于杂交稻种子带菌及保活剂处理与生活力的关系以及杂交水稻种子健康度、生活力与发芽率的相关性方面的研究<sup>[14-16]</sup>。

水稻是我国最重要的粮食作物之一,主栽区域分布很广,生态气候条件各异,研究和解析水稻种子的健康状况,设计良种包衣消毒处理预防病害随种子传播,对于保护水稻生产具有重要意义。关于水稻种子健康检测,分别描述和应用传统方法和现代分子生物学方法,或者采用多种方法针对同一靶标病菌的检测报道较多<sup>[2,10-13]</sup>,但鲜有以不同产地来源、不同海拔高度的水稻种子为样本开展多种检测方法的对比分析的报道。本研究通过分析现有的洗

涤法、PDA 平板法、滤纸保湿法应用于水稻种子寄藏真菌检测的异同和适应性,旨在揭示种子类型、来源、产地海拔高度与种子寄藏真菌种类的关系,为提高水稻种子健康检测的针对性提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 种子样品

供试水稻种子共 20 份样品(表 1),均由云南省农科院农作物原种繁育中心提供,其中大部分样品已由丹麦 WESTRP 小型试验室风筛精选机精选。种子样品包含了粳稻、籼稻、糯籼稻 3 种类型,既有杂交种,也有地方种,种子产地海拔分布在 23.3~1 860.0 m,涵盖了 10 个梯度,跨度约为 1 836 m。所有样品种子为 2005—2008 年生产(表 1)。

### 1.2 水稻种子寄藏真菌检测方法

参考 ISTA 种子健康检测操作规程,采用洗涤法、PDA 平板法及滤纸保湿法 3 种方法,检测供试水稻品种种子上携带真菌的种类、部位及数量,评价 3 种方法的特点。

#### 1.2.1 洗涤法

通过预备试验明确带菌率较高的种子样品,在此基础上选取编号为楚粳 26、滇优 35、宜香 9 的品种种子进行洗涤法检测,从 3 个供试品种中随机选出 100 粒种子,放入已灭菌的 250 mL 三角瓶中,加入 25 mL 无菌水,封口。置于转速为 150 r/min, 25 °C 的摇床中充分震荡 20 min(设置另外一组为 1 h),收集悬浮液于已灭菌的 10 mL 离心管中,以 3 000 r/min 的转速离心 10 min,去上清液,加少量无菌水悬浮沉淀;将悬浮液用无菌水进行 10 倍系列梯度稀释(设置另外 2 组分别为悬浮液原液和浓缩 10 倍 2 组试验),每组试验选择不同稀释梯度后分别涂 PDA 平板培养,以便从中选择最佳涂板浓度。每个浓度各吸取 100  $\mu$ L 加到 9 cm 直径 PDA 平板上(添加硫酸链霉素抑制细菌生长造成的干扰),用涂布器

表1 供试种子样品背景信息

Table 1 General information of experimental seed samples

样品编号	品种名称	种子类别	产地	产地海拔/m	生产日期
1	富优 80	三系杂交籼稻 F <sub>1</sub> 代种	云南省昭通市水富县	600	2007 年 8 月
2	云光 32	两系杂交籼稻 F <sub>1</sub> 代种	云南省昭通市水富县	600	2007 年 8 月
5	冈优 827	三系杂交籼稻 F <sub>1</sub> 代种	四川省眉山市洪雅县	450	2008 年 8 月
6	D 优 202	三系杂交籼稻 F <sub>1</sub> 代种	四川省眉山市洪雅县	450	2008 年 8 月
10	云光 14	两系杂交籼稻 F <sub>1</sub> 代种	湖北省仙桃市陈场镇	300~350	2008 年 9 月
12	鄂粳杂 1 号	两系杂交籼稻 F <sub>1</sub> 代种	湖北省仙桃市陈场镇	300~350	2008 年 9 月
14	版纳 10 号	常规糯籼稻种(地方种)	云南省景洪市嘎洒镇	560	2008 年 10 月
15	博绿矮	常规籼稻种(地方种)	云南省景洪市嘎洒镇	560	2008 年 10 月
16	滇瑞 449	常规籼稻种(老品种)	云南省景洪市嘎洒镇	560	2008 年 10 月
17	傣黎 406	常规籼稻种(地方种)	云南省景洪市嘎洒镇	560	2008 年 10 月
18	楚粳 26	常规粳稻种	云南省楚雄市	1 800~1 850	2008 年 10 月
20	楚粳 28	常规粳稻种	云南省楚雄市	1 800~1 850	2008 年 10 月
22	汕优多系 1 号	三系杂交籼稻 F <sub>1</sub> 代种	云南省普洱市景东县	1 100~1 150	2008 年 7 月
23	Ⅱ 优 63	三系杂交籼稻 F <sub>1</sub> 代种	云南省普洱市景东县	1 100~1 150	2008 年 7 月
32	滇杂 31	三系杂交粳稻 F <sub>1</sub> 代种	云南省普洱市景谷县	910	2008 年 9 月
33	滇优 35	三系杂交粳稻 F <sub>1</sub> 代种	云南省普洱市景谷县	910	2008 年 9 月
34	宜香 9	三系杂交籼稻 F <sub>1</sub> 代种	湖北省武汉市	23.3	2007 年 10 月
37	靖粳 8 号	常规粳稻原原种	云南省曲靖市沾益县	1 860	2008 年 10 月
39	靖粳 16 号	常规粳稻原原种	云南省曲靖市沾益县	1 860	2008 年 10 月
41	Ⅱ 优 86	三系杂交籼稻 F <sub>1</sub> 代种	云南省普洱市镇沅县	900	2005 年 8 月

涂匀。相同操作下设无菌水空白对照;每个处理设 4 次重复。将培养皿倒置放入 37 °C 恒温箱中,黑暗条件下培养 4 d 后观察,记录 PDA 培养皿上所生长真菌的种类和数量。根据同步设置的摇床震荡时间,以及洗涤后悬浮液的浓度试验,比较分析其对洗涤法观察结果的影响。

### 1.2.2 PDA 平板法

选取楚粳 26、滇优 35、宜香 9 共 3 个水稻品种的种子在 5% 次氯酸钠溶液中浸泡 8 min,然后用无菌水冲洗 3 遍,取 40 粒种子将其解剖为颖壳和米粒,并将米粒在 5% 的次氯酸钠溶液中浸泡 8 min 进行表面消毒,然后用无菌水冲洗 3 遍,晾干备用。分别将同一品种消毒过的整粒种子、颖壳和米粒均匀摆放在 9 cm 直径 PDA 平板上,每皿摆放 10 粒,每个处理 4 次重复,相同操作下用空白的 PDA 平板作为环境对照。试验同时设置整粒未消毒种子上寄

藏带菌的检测:将供试品种的水稻种子,不经过表面消毒直接摆置于 9 cm 直径的 PDA 平板上,每皿摆放 10 粒,每个处理 4 次重复;置于 25 °C 温箱中 12 h 光照/黑暗交替下培养 6 d 后检查,记录种子以及不同解剖部位携带的真菌种类和数量。

### 1.2.3 滤纸保湿法

以表 1 中供试水稻品种种子为试验材料。用无菌水将已灭菌的 9 cm 滤纸润湿,置于已灭菌的 9 cm 培养皿盖中,每一皿中叠放 3 层湿润滤纸,在每一皿的滤纸上,按同心圆形式摆放 25 粒种子,每一处理设 4 次重复,共计 100 粒种子;先置于 25 °C 温箱中 12 h 光照下培养 12 h,再置于 -20 °C 冰箱中保持 12 h,冷冻环境是吸胀后的种子死亡从而抑制种子发芽;而后置于 25 °C 温箱中 12 h 光照/12 h 黑暗交替下培养 5 d 后观察,记录种子携带真菌种类和数量。试验过程中在无菌条件下适时添加无菌水

保证滤纸的湿度。

#### 1.2.4 贮藏真菌的鉴定

将上述3种方法分离得到的各种真菌,用PDA培养基进行纯化和保存。用解剖镜(主要针对滤纸法)和显微镜进行镜检,对难产孢的真菌通过延长培养时间或用黑光灯照射诱导促使产孢,根据真菌的培养性状,尤其菌丝、孢子梗和孢子等形态特征,参考丹麦种子健康中心《水稻种传病害及种子健康检测》等资料和工具书鉴定到属。

## 2 结果与分析

### 2.1 洗涤法带菌检测结果

检测结果显示(表2),3个供试的水稻品种种子表面携带有 *Aspergillus*、*Fusarium*、*Penicillium*、*Alternaria*、*Rhizopus*、*Trichoderma*、*Mucor* 等属真菌,其出现的比例分别为 21.4%、17.9%、16.7%、8.3%、6.0%、2.4%和 1.2%,还有部分检测到但待鉴定的菌落约占 26.2%。

表2 洗涤法检测不同水稻种子样品的带菌情况

Table 2 Result of washing testing method for rice seed associated fungi

品种名称	出现的真菌菌落数(百分率/%)								合计
	<i>Aspergillus</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>Mucor</i>	unknown	
楚粳 26	—	7(23.3)	9(30.0)	—	2(6.7)	2(6.7)	1(3.3)	9(30.0)	30(100)
滇优 35	13(39.4)	3(9.1)	5(15.2)	7(21.2)	—	—	—	5(15.2)	33(100)
宜香 9	5(23.8)	5(23.8)	—	—	3(14.3)	—	—	8(38.1)	21(100)
合计	18(21.4)	15(17.9)	14(16.7)	7(8.3)	5(6.0)	2(2.4)	1(1.2)	22(26.2)	84(100)

注:—为未检出。下表同。

#### 2.1.1 洗涤时间对检测结果的影响

本试验中设置 20 和 60 min 2 组洗涤时间试验,比较其对洗涤液中真菌种类和数量的影响,结果显示 2 组时间所得的菌落密度和种类并无明显差异;从试验操作简便易行和低耗的角度出发,20 min 为适宜的洗涤时间。

#### 2.1.2 洗涤液浓度对观测的影响

试验中设置洗涤液原液、洗涤液原液浓缩 10

倍、洗涤液原液稀释 10 倍 3 个浓度。结果显示,对大多数供试水稻品种而言,洗涤液稀释 10 倍为最佳涂板浓度,此浓度下的 PDA 平板上着生的真菌菌落清晰、密度适中,能较清晰地反映出菌悬液中真菌的种类和数量情况,便于观察、计数和纯化。

### 2.2 PDA 平板法检测结果

结果见表 3。分析显示,3 个供试的水稻品种种子的米粒上均未检测到真菌。按照各品种种子的颖

表3 PDA 平板法检测不同水稻种子样品的带菌情况

Table 3 Result of PDA culture plate method for rice seed associated fungi

品种编号	检测部位	出现的真菌菌落数(百分率/%)						合计
		<i>Aspergillus</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Rhizopus</i>	unknown	
楚粳 26	米粒	—	—	—	—	—	—	—
	颖壳	4(44.4)	—	2(22.2)	—	—	3(33.3)	9(100)
	整粒	4(36.4)	—	2(18.2)	—	—	5(45.5)	11(100)
滇优 35	米粒	—	—	—	—	—	—	—
	颖壳	8(72.7)	2(18.2)	—	—	—	1(9.1)	11(100)
	整粒	9(36.0)	11(44.0)	—	1(4.0)	—	4(16.0)	25(100)
宜香 9	米粒	—	—	—	—	—	—	—
	颖壳	3(27.3)	4(36.4)	—	—	—	4(36.4)	11(100)
	整粒	7(46.7)	4(26.7)	—	—	2(13.3)	2(13.3)	15(100)
合计	35(42.7)	21(25.6)	4(4.9)	1(1.2)	2(2.4)	19(23.2)	82(100)	

壳、整粒综合计算,其携带的寄藏真菌种类由高到低分别为: *Aspergillus*、*Fusarium*、*Alternaria*、*Penicillium* 和 *Rhizopus*, 它们的分离频率分别为 42.7%、25.6%、4.9%、1.2% 和 2.4%, 亦有部分检测到但待鉴定的菌落约占 23.2%。

### 2.3 滤纸保湿法检测结果

检测结果显示(表 4),使用滤纸保湿法对 3 个供试的水稻品种检测,共检出 *Aspergillus*、

*Fusarium*、*Penicillium*、*Alternaria*、*Rhizopus*、*Trichoderma*、*Mucor* 等 18 个属真菌,明显多于其他 2 种方法检出的结果。其出现的比例分别为 21.4%、17.9%、16.7%、8.3%、6.0%、2.4% 和 1.2%, 还有部分检测到但待鉴定的菌落约占 11.4%。滇优 35、宜香 9、楚粳 26 样品的检测结果和研究中洗涤法、PDA 平板法的检测结果具有吻合性,且结果互为支持。

表 4 洗涤法检测不同水稻种子样品的带菌情况

Table 4 Result of blotter moisture-retaining culture method for rice seed associated fungi

品种名称	出现的真菌菌落数(百分率/%)						
	<i>Alternaria</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Cercospora</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Curvularia</i>	<i>Epicoccum</i>
楚粳 26	2(0.03)	—	—	1(0.01)	—	—	1(0.01)
滇优 35	7(0.07)	35(0.34)	—	—	3(0.03)	2(0.02)	—
宜香 9	—	21(0.25)	4(0.05)	—	—	4(0.05)	—
合计	9(0.03)	56(0.21)	4(0.02)	1(0.004)	3(0.01)	6(0.02)	1(0.004)

  

品种名称	出现的真菌菌落数(百分率/%)						
	<i>Fusarium</i>	<i>Mucor</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Pyricularia</i>	<i>Rhizoctonia</i>	<i>Rhizops</i>	<i>Sclerotium</i>
楚粳 26	11(0.14)	—	16(0.21)	1(0.01)	7(0.09)	—	2(0.03)
滇优 35	24(0.23)	3(0.03)	17(0.17)	—	—	—	5(0.05)
宜香 9	10(0.12)	—	11(0.13)	—	4(0.05)	3(0.04)	—
合计	45(0.17)	3(0.01)	44(0.17)	1(0.004)	11(0.04)	3(0.01)	7(0.03)

  

品种名称	出现的真菌菌落数(百分率/%)					合计
	<i>Tilletia</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>Ustilagoidea</i>	<i>Verticillium</i>	unknown	
楚粳 26	—	3(0.04)	—	19(0.25)	13(0.17)	76(100)
滇优 35	—	—	—	—	7(0.07)	103(100)
宜香 9	13(0.15)	—	4(0.05)	—	10(0.12)	84(100)
合计	13(0.05)	3(0.01)	4(0.02)	19(0.07)	30(0.11)	263

使用滤纸保湿法检测 20 个供试水稻种子样品(表 5),共检测出 1 201 个菌落,其中明确分类地位的有 1 045 个菌落,分属于 24 个属的真菌,属中有的包含不同种;尚有部分检测到但待鉴定的菌落,共计 156 个,约占总菌落的 13.0%,按照属水平归纳统计表明,以 100 粒种子上分离菌株的次数评价,有 5 个品种的水稻种子带菌数量最多,按照由高到低依次为滇优 35、宜香 9、楚粳 26、靖粳 16 号、汕优多系 1 号;以 100 粒种子上分离菌株的种类评价,有 5 个品种的水稻种子带菌种类最多,按照由高到低依

次为冈优 827、D 优 202、Ⅱ优 63、楚粳 26、楚粳 28。

供试品种的水稻种子上寄藏真菌种类中, *Aspergillus*、*Fusarium* 和 *Penicillium* 分布最广,出现频率最大,分别在 14、19 和 18 个供试品种中检测到(表 5)。进一步分析显示,这 3 个属的真菌在杂交水稻品种的种子(如滇优 35;宜香 9)上携带最多,而在来自云南省景洪市嘎洒镇的 2 个品种(版纳 10 号,常规糯籼稻种,地方种;博绿矮,常规籼稻种,地方种)的种子样品中,上述 3 个属的真菌的出现比率较其他多数品种明显较少。

表5 滤纸保湿法检测20个水稻种子样品的带菌情况  
Table 5 Result of blotter moisture-retaining culture method for 20 varieties rice seeds associated fungi

真菌属名	分离菌株数																				品 种 数	
	高优80	云光32	冈优827	D优202	云光14	鄂梗杂1号	版纳10号	博绿矮	滇瑞449	傣黎406	楚梗26	楚梗28	油优多1号	Ⅱ优63	滇杂31	滇优35	宜香9	端梗8号	端梗16号	Ⅱ优86		合计
<i>Acremonium</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	—	—	—	—	3	—	—	7	2
<i>Alternaria</i>	—	—	—	4	—	9	2	—	—	—	2	5	1	—	—	7	—	—	—	5	35	8
<i>Aspergillus</i>	16	17	—	2	14	12	—	14	—	—	—	—	27	6	8	35	21	5	19	16	212	14
<i>Aureobasidium</i>	—	—	6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6	1
<i>Bipolaris</i>	—	—	—	1	—	—	—	—	2	—	—	—	—	3	—	—	—	—	1	—	7	4
<i>Botrytis</i>	8	2	4	9	5	—	3	3	2	3	—	—	—	—	—	—	4	6	—	2	48	11
<i>Cercospora</i>	—	—	—	2	—	—	—	1	—	—	1	—	—	3	—	—	—	—	2	—	9	5
<i>Cladosporium</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	—	—	—	—	3	1
<i>Curularia</i>	—	—	2	—	1	3	—	—	—	—	—	1	3	4	—	2	4	—	7	2	29	10
<i>Ehlersia</i>	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—	—	4	3
<i>Fusarium</i>	7	11	9	8	5	13	—	14	5	15	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1
<i>Epicoccum</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	11	4	13	7	14	24	10	15	6	4	185	19
<i>Macor</i>	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	3	—	—	—	—	5	3
<i>Penicillium</i>	6	8	8	13	6	—	—	13	5	16	2	7	7	23	29	17	11	16	12	9	209	18
<i>Phoma</i>	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1
<i>Pyrenochaeta</i>	—	—	3	6	—	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	13	4
<i>Pyricularia</i>	—	—	4	2	—	1	—	—	—	—	1	2	—	2	—	—	—	—	—	—	12	6
<i>Rhizoctonia</i>	2	—	12	—	2	—	—	1	4	—	7	3	6	2	—	—	4	12	7	—	62	12
<i>Rhizopus</i>	—	5	4	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	3	2	—	—	16	5
<i>Scerotium</i>	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	3	—	—	5	5	—	2	—	—	20	6
<i>Tilletia</i>	3	2	4	—	13	—	—	3	9	6	—	—	4	7	—	—	13	4	5	—	73	12
<i>Trichoderma</i>	1	2	—	—	—	—	—	—	—	—	3	—	2	—	—	—	—	—	—	—	8	4
<i>Ustilaginoides</i>	—	—	—	7	—	2	—	1	—	—	—	—	3	8	—	—	4	—	7	12	44	8
<i>Verticillium</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	19	4	—	—	—	—	—	—	—	—	3	26	3
Unknown	2	8	5	11	15	8	3	7	9	5	13	11	9	6	5	7	10	4	8	10	156	20
数量总计	48	55	62	66	61	51	9	30	67	33	76	40	75	73	61	103	84	69	75	63	1 201	—
真菌属数	8	7	11	11	7	7	3	8	7	4	9	10	9	11	4	8	9	9	10	8	24	—

## 3 讨论

### 3.1 3种检测方法的比较分析

从试验器材及过程要求、试验耗时、操作简易程度、抑制种子发芽、真菌菌落的判读、每粒种子上可长1种以上真菌、检测带菌的部位、检测出的真菌种类、真菌生长受细菌的影响、真菌生长受根霉和毛霉的影响、优势菌抑制其他真菌的生长、筛选特定真菌或细菌的需要等方面综合评价3种检测方法(表6)如下:

#### 3.1.1 洗涤法

适宜用于水稻种子外部携带真菌检测,可结合选择性培养基或半选择性培养基分离鉴定目标菌。此方法耗时较短,一般3~5 d左右,但涂板浓度无法事先确定,只能通过梯度稀释并涂板,选择一个较适宜的涂板浓度,培养得到的菌落可能相互连接甚至覆盖;某些带菌量较少或孢子萌发和菌丝生长缓慢的真菌易受到优势菌的竞争干扰,菌落较小或无可见菌落生长,难于分离。

#### 3.1.2 PDA 平板法

适宜于检测水稻种子寄藏真菌带菌部位和各个部位带菌情况。此方法可以分别检测出整粒种子、颖壳及其内外表皮等不同部位的带菌情况,可以用于水稻种子健康、种传病害和靶标病原菌的研究;可

以与选择性培养基或半选择性培养基结合使用,针对性地高效检测到种子解剖部位的目标菌;耗时较短,一般3~5 d。此方法的问题与洗涤法相同。每粒种子周围一般可以分离获得1~2种优势菌;培养得到的菌落可能相互连接甚至相互覆盖,不易分离;有些分离物的菌丝生长旺盛,产孢少,难以鉴定;某些数量较少、生长慢的菌易受到优势菌的竞争和影响,可能菌落较小甚至无可见菌落生长;伴随种子发芽产生的物质可能影响整粒种子的检测结果。

#### 3.1.3 滤纸保湿法

此方法最适宜于水稻种子整体寄藏真菌的检测,分离获得的真菌种类较前述洗涤法、PDA平板法2种方法的多;优势菌对其他菌的影响较小;菌落多数易产孢,易于观察和借助实体显微镜鉴定;一粒种子上可长出多种菌落,更接近种子寄藏真菌的实际情况;所需仪器和支持条件简单,操作过程便捷。根霉、毛霉等生长迅速的菌对其他菌的影响较小。此方法的问题是耗时稍长,一般5~7 d;不适宜于检测特定的靶标菌;无法确定寄藏真菌的带菌部位。滤纸保湿法可以简便快速检测水稻种子上的带菌情况,为种子消毒处理和预防保健实践中药剂的筛选提供依据。

本研究中未能、理论上也不可能将供试种子样品中所有寄藏的真菌都检测出来。首先因为试验设

表6 3种检测水稻种子寄藏真菌方法的对比分析

Table 6 Comparative analysis of three kinds of testing methods for rice seed associated fungi

比较项目	检测方法		
	洗涤法	PDA 平板法	滤纸保湿法
试验器材及试剂要求	较滤纸法多	较滤纸法多	基本不需要
试验耗时/d	3~5	3~5	5~7
操作简易程度	较滤纸法繁琐	与洗涤法相似	较简易
抑制种子发芽	否	否	是
真菌菌落相对独立	否	否	是
每粒种子上可长1种以上真菌	—	否	是
检测带菌的部位	只限外表面	是	否
检测出的真菌种类	较滤纸法少	较滤纸法少	较前两种方法多
真菌生长受细菌影响	是	是	否
真菌生长受根霉、毛霉影响	是	是	否
优势菌抑制其他真菌的生长	是	是	影响较小
筛选特定真菌或细菌	是	是	否

计的培养条件只适宜于种子上携带的大部分真菌的生长,部分对营养有特殊需要的真菌可能在本试验条件不易或不能生长;其次,滤纸保湿法操作过程中为了避免种子发芽顶开培养皿盖的问题,设置了一20℃冰箱中培养12h环节,使吸水膨胀的种子的细胞间结冰而死亡,失去发芽能力,此操作也可能使种子寄藏的某些不耐低温的真菌死亡,因而无法检测到;第三,本试验所用方法无法检测出带菌量较低的真菌。

分析认为,洗涤法、PDA平板法和滤纸保湿法各有优点和局限性,实际应用中必须考虑水稻种子检测的目的来选择适宜的方法。

### 3.2 品种类型、种子来源及海拔高度与寄藏真菌种类的关系

#### 3.2.1 品种类型及寄藏真菌种类的关系

杂交水稻品种与地方品种的水稻种子带菌情况有较大差异,表现为杂交水稻的平均带菌种类及数量均比地方品种多。可能的原因是地方种在制种基地(种植地点)的地理和气候环境条件下,适合于种子寄藏的相关真菌的接种体种类少,或者接种体的浓度未达到形成侵染的水准,或种子上寄藏真菌数量非常少,用本研究设计的3种方法无法检测到。

杂交水稻种子寄藏的真菌种类不同,可能由于杂交水稻本身的特点决定。杂交水稻种子的母本花期长、颖颖角度大、柱头外露率高为特点,给适合于种子寄藏的真菌,特别是侵染花期的水稻病原真菌提供了更多进入种子颖壳的通道,因此杂交水稻种子上寄藏的真菌数量较多、种类复杂。地方种水稻种子带菌种类和数量均较低,可能与其所处的水稻产区水稻病害病发生程度或者病原物原接种体密度较低,或者这些品种的水稻具有尚待解析的遗传性状,使其种子在发育过程中对真菌寄藏具有耐病性或抗病性。

#### 3.2.2 地域来源及寄藏真菌种类的关系

从供试水稻种子样品的地域来源分析,冈优827、D优202这2个品种来自四川,云光14、鄂梗杂1号、和宜香9来自湖北,其余15个品种均来自云南。可能由于不同制种基地地理位置差异伴随的气候差异的原因,造成来自相同地域的品种间种子寄藏真菌种类和数量的差异比来自不同地域的品种间的差异小;来自相同或相距较近地域的品种,带菌种类和数量差异较小,可以认为水稻种子寄藏真菌和健康状况与种子产地的地域环境条件关系密切。

#### 3.2.3 海拔高度和寄藏真菌种类的关系

本研究中靖粳8号和靖粳16号的海拔高度最高,达1860m;楚粳28和楚粳26海拔高度次之,为1800~1850m;海拔最低的品种为宜香9,为23.3m。分析不同海拔梯度下的水稻品种的带菌情况,未发现随着海拔高度与种子寄藏真菌的种类和数量有明显的相关关系。供试品种之间,除了海拔不同之外,还有籼稻/粳稻、杂交稻/地方稻、同一海拔的不同地区、水分含量等的差异,即使带菌情况有明显差异,也无法确定带菌情况差异是否由海拔差异引起。

高海拔(1800~1850m)的楚粳26品种种子寄藏真菌的情况在所有供试的20个品种中表现为带菌种类较多、数量较大,同时从其上分离得到4种菌落形态奇特、在其他品种种子上均未分离得到的待鉴定的真菌。分析认为该样品的水稻种子带菌情况可能与其所处海拔、产地(云南省楚雄市)和品种(常规粳稻种)等因素有关,也有可能与其水分含量(13.8%)较其他品种的水分含量(12%~13%)高有关。与此相反,海拔高度为560m的版纳10号是20个供试水稻品种中唯一的糯籼稻(其余均为粳稻或籼稻),其种子带菌种类很少(3种),带菌量也较低(9个菌落)。推测可能与其产地的地理位置及气候有关,云南省景洪市地处热带与温带之间,其特定的气候可能不适宜水稻种子寄藏真菌或者种传病菌的生长,或者其偏远的地理位置可能形成了物理上的天然屏障,阻挡了来自于母体植株以外的种传病害的传播途径,减少了种子寄藏真菌的种类和数量。

### 3.3 检测过程中杂菌污染防治的方法

#### 3.3.1 培养基中添加硫酸链霉素防细菌的污染

在洗涤法和PDA平板法中,添加50μg/mL的硫酸链霉素可以较好的抑制细菌的生长,抗生素硫酸链霉素对种子寄藏真菌的生长基本无抑制作用,可以排除细菌造成的污染干扰和对检测结果观测的影响。滤纸保湿法中细菌生长较少或者基本不生长,故滤纸保湿法检测中不必添加硫酸链霉素。

#### 3.3.2 培养基中五氯硝基苯防真菌杂菌的污染

在洗涤法和PDA平板法的检测中,通常容易出现污染菌根霉和毛霉,二者生长迅速,很容易覆盖培养基的大部分,影响种子上寄藏的其他真菌的生长。本研究在洗涤法和PDA平板法中添加浓度为50μg/mL的五氯硝基苯(PCNB),观察到培养基中药剂对检测种子寄藏真菌无明显抑制作用,可以有



效的抑制操作环境中种子表面本身所携带的根霉 (*Rhizopus* sp.) 对检测结果的影响。

## 4 结 论

### 4.1 3种检测方法的适应性

本研究对比分析了水稻种子寄藏真菌的3种检测方法,表明洗涤法适宜于水稻种子外部携带真菌的检测,可结合选择性培养基或半选择性培养基分离鉴定目标菌;PDA平板法适宜于检测水稻种子带菌部位和各个部位带菌情况;滤纸保湿法适宜于检测水稻种子的整体带菌情况。实际工作中,可以根据水稻种子检测的目的是确认健康状况、病害检疫还是为药剂处理提供依据来选择3种方法之一,或者组合使用。为了准确鉴定检测到的分离物的分类地位,还应该应用分子生物学的手段,或者结合致病性检测活体试验,来确定分离物的致病性和致病力。

### 4.2 水稻种子携带真菌的情况

研究证实,类型和来源、产地海拔高度不同、不同品种间以及杂交稻和地方种之间的种子寄藏真菌种类存在差异。本研究涉及的20份供试水稻种子种子寄藏的真菌主要有 *Aspergillus*、*Fusarium*、*Penicillium* 和 *Alternaria* 4个属,还有其他20个属的真菌。种类具有多样性,数量具有差异性。检测到的 *Bipolaris*、*Fusarium*、*Pyricularia*、*Alternaria*、*Rhizoctonia*、*Ephelis*、*Cercospora* 等属的真菌是否为水稻生产中潜在的种传病害病原菌需要开展致病性和发生危害规律等方面的研究。研究中检测到水稻种子上携带包括 *Mucor*、*Penicillium*、*Aspergillus* 等属在内的腐生真菌,它们在种子贮藏阶段适宜的温度和湿度条件下,极易造成种子霉变烂种或者产生毒素,所以,在水稻种子消毒处理和预防保护药剂选择时也应一并高度重视。

## 参 考 文 献

[1] Agarwal V K, Sinclair J B. Principles of Seed Pathology[M]. Boca Raton FL :CRC Press Inc, 1987

- [2] Mew T W, Misra J K. A Manual of Rice Seed Health Testing [M]. IRRI Press, 1994
- [3] Wulff E G, Sørensen J L, Lübeck M, et al. *Fusarium* spp. associated with rice Bakanae: Ecology, genetic diversity, pathogenicity and toxigenicity [J]. Environmental Microbiology, 2010, 12(3): 649-657
- [4] Cottyn B, Debode J, Regalado E, et al. Phenotypic and genetic diversity of rice seed-associated bacteria and their role in pathogenicity and biological control [J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 107(3): 885-897
- [5] Sisterna M N, Dal Bello G M. *Curvularia protuberata*, a new seed-borne pathogen of rice [J]. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica, 1998, 33(1/2): 111-114
- [6] Khokon M A R, Meah M B, Fakir G A. Inert matter with rice and wheat seeds is source of inoculum of plant pathogens [J]. Seed Science and Technology, 2005, 33(1): 127-140
- [7] Faiad M G R, Wetzel M M V S, Salomão A N, et al. Evaluation of fungi in seed germplasm before long term storage [J]. Seed Science and Technology, 1996, 24 (3): 505-511
- [8] Guerreiro F C, Mathur S B, Neergaard P. Seed health testing of rice V. Seed borne fungi associated with abnormal seedlings of rice [J]. Proceedings of the International Seed Testing Association, 1972, 37: 985-997
- [9] Kim W G, Park J S, Yu S H. Seed infection and damage to rice seeds and seedlings by seedborne *Gerlachia oryzae* [J]. Korean Journal of Plant Protection, 1984, 23: 126-131
- [10] 台莲梅, 盖世武, 辛惠普. 黑龙江省垦区水稻种子病原真菌鉴定 [J]. 黑龙江农业科学, 2002(2): 5-7
- [11] 马炳田, 王玲霞, 李仕贵, 等. 四川省杂交水稻种子寄藏真菌研究 [J]. 种子, 2008, 27(1): 1-5
- [12] 刘西莉, 李健强, 张龙, 等. 水稻种子寄藏的2种柱链孢菌检测与鉴定 [J]. 植物病理学报, 2002, 32(1): 93-94
- [13] 刘西莉, 李健强, 朱春雨, 等. 不同水稻品种种子带菌检测及药剂消毒处理效果 [J]. 中国农业大学学报, 2000, 5(5): 42-47
- [14] 罗宽, 戴良英, 廖晓兰, 等. 杂交稻种子带菌及保活剂处理与生活力的关系 [J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2002, 28(4): 317-319
- [15] 杨勋毅, 王楚桃, 刘希真, 等. 杂交水稻种子健康度、生活力与发芽率的相关性的分析 [J]. 南方农业, 2008, 2(7): 5-6
- [16] Hewett P D. Pathogen viability on seed in deep freeze storage [J]. Seed Science and Technology, 1987, 15: 73-77

(责任编辑: 袁文业)